

**Die biologische Halbwertszeit von  
exogenem ACTH im menschlichen Blut**

Manfred Fischer

1965



Aus der Abteilung für Klinische Endokrinologie  
(Leiter: Prof. Dr. med. E.F. Pfeiffer)

der

I. Medizinischen Universitätsklinik  
Frankfurt am Main

(Direktor: Prof. Dr. med. F. Hoff)

Die biologische Halbwertszeit von exogenem ACTH  
im menschlichen Blut

---

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin

der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Manfred Fischer  
aus Berlin

Frankfurt am Main 1965

Dekan ; Prof. Dr. med. H. Frick

Referent ; Prof. Dr. med. E.F. Pfeiffer

Korreferent ; Prof. Dr. med. L. Heller

Mündliche Prüfung : 18. Juni 1965



Herrn Prof. Dr. med. E.F. Pfeiffer, Leiter der Abteilung für Klinische Endokrinologie, I. Medizinische Universitätsklinik, Frankfurt am Main, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die mir bei der Arbeit gewährte Unterstützung danken.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. med. K. Retiene und Herrn Priv. Doz. Dr. med. H. Ditschuneit, die mir während der Versuche jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

## Disposition

|                                                                                                      | Seite  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| A. <u>Einleitung</u>                                                                                 | 4      |
| I. Kurzer geschichtlicher Überblick über das ACTH                                                    |        |
| II. Die älteren Methoden zur Bestimmung von ACTH                                                     | 5      |
| III. Frühere Bestimmungen der Halbwertszeit von ACTH                                                 | 6      |
| B. <u>Versuchsanordnung und Methodik</u>                                                             | 9      |
| I. Allgemeine Versuchsanordnung                                                                      |        |
| II. Die Methodik der ACTH-Bestimmung                                                                 | 11     |
| 1. Die Hypophysenblockade mit Dexamethason                                                           |        |
| 2. Die operative Technik                                                                             |        |
| 3. Die Bestimmung von Corticosteron im Rattenplasma                                                  | 12     |
| a) Extraktionsverfahren                                                                              | 13     |
| b) Fluoreszenzmessung des Corticosterons und Berechnung                                              | 14     |
| C. <u>Ergebnisse</u>                                                                                 | 16     |
| I. Die Halbwertszeit von ACTH nach Injektion verschieden großer Hormonmengen ( 10 E, 25 E und 50 E ) |        |
| II. Die Halbwertszeit von ACTH nach intravenöser Dauertropfinfusion von 25 E                         | 17     |
| D. <u>Besprechung der Ergebnisse</u>                                                                 | 18     |
| E. <u>Zusammenfassung</u>                                                                            | 22     |
| <br><u>Abbildungen</u>                                                                               | <br>24 |
| <u>Tabellen</u>                                                                                      | 28     |
| <u>Literaturverzeichnis</u>                                                                          | 30     |

## A. Einleitung

### I. Kurzer geschichtlicher Überblick über das ACTH

In den letzten Jahren sind die Proteinhormone in den Mittelpunkt der innersekretorischen Forschung getreten, nachdem verschiedene spezifische und genügend empfindliche biologische Meßverfahren gefunden wurden. Damit konnten die Hormone auch im Blut des Menschen unter normalen und pathologischen Bedingungen untersucht werden.

Die Entdeckung der chemischen Struktur des ACTH begann mit zwei verschiedenen Polypeptiden, dem Corticotropin A aus Schweinehypophysen von White (1953), das aus nicht hydrolysiertem Material gewonnen wurde, und dem Corticotropin B von Bazemoore et al. (1953), aus hydrolysiertem Material. Bell (1955) beschrieb ein  $\beta$ -Corticotropin, welches aber wohl identisch ist mit dem Corticotropin A, Li et al. (1955) ein  $\alpha$ -Corticotropin aus Schafshypophysen.

Erst 1959 stellten Lee et al. die Struktur vom menschlichen ACTH auf. Dieses besteht aus einer Polypeptidkette mit 39 Aminosäuren und weist gegenüber den einzelnen Tierspezies nur geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf. Ob es sich bei diesen nach Adsorption und Reinigung an Austauschern, durch Papierchromatographie und Gegenstromverteilung gewonnenen Bruchstücken um die Form handelt, in der das endogene ACTH des Menschen vorliegt, ist bis heute ungeklärt. Boissonnas et al. (1956), Schwyzer et al. (1960) und Li et al. (1961) fanden, daß das erste synthetische ACTH-Präparat, ein Nonadekapeptid, sich in einer Sequenz von 19 Aminosäuren, ausgehend von der endständigen Aminogruppe, mit der vom Schweine-, Rinder- und Schaf-ACTH deckt.

Bislang gibt es zur Identifizierung von ACTH noch keine einfachen chemischen Methoden. Die biologische Wirkung ist daher der einzige Hinweis auf das Vorhandensein oder Fehlen des Hormons.

Mit Ausnahme der soeben entwickelten radio-immunologischen Techniken sind alle gebräuchlichen Nachweismethoden von ACTH indirekte, biologische Meßverfahren mit den damit verbundenen Fehlerquellen. Erst seit kurzem konnten mit diesen Methoden zum erstenmal ACTH-Blutspiegeluntersuchungen beim Versuchstier und beim Menschen durchgeführt werden. Im folgenden sollen kurz die wichtigsten Bestimmungsmethoden aufgeführt werden.

## II. Die älteren Methoden zur Bestimmung von ACTH

Das heute von der Industrie zur Standardisierung von ACTH benutzte Verfahren wurde von Sayers et al. (1948) entwickelt. Nach intravenöser Injektion von ACTH bei hypophysektomierten Ratten wird der Ascorbinsäureabfall von Nebennierenschnitten als Parameter für die ACTH-Messung benutzt. Die untere Grenze der Empfindlichkeit liegt bei 3,0 - 1,0 mE. Empfindlichere Ergebnisse erhielten Munson und Toepel (1958) mit dem modifizierten Sayers-Test, indem sie nicht den Ascorbinsäureverlust in der Nebenniere, sondern seine Zunahme im Nebennierenvenenblut der hypophysektomierten Ratte bestimmten.

Mit der Methode von Nelson und Hume (1955) wird die ACTH-Wirkung am Anstieg von Hydrocortison ( 17-Hydroxy-Corticosteron ) im Nebennierenvenenblut des hypophysektomierten Hundes gemessen. Lipscomb und Nelson (1959) erreichten durch Bestimmung des Corticosteronanstiegs im Nebennierenvenenblut hypophysektomierter Ratten eine untere Grenze der Empfindlichkeit von 0,2 mE ACTH. Pfeiffer et al. (1960) entwickelten einen ACTH-Test, bei dem der Anstieg von Corticosteron im peripheren Blut gemessen wur -

de. Die Hypophysektomie ersetzten sie durch chemische Hypophysenblockade mit i.v.-injiziertem wasserlöslichem Dexamethason ( 9 Fluoro - 16 Methyl, Dehydro - Hydrocortison ). Es besitzt gegenüber anderen Steroiden den Vorteil, daß es keine Fluoreszenz zeigt, wenn man es als Hemisuccinatverbindung verwendet. Vergleichsweise liegt die Fluoreszenz von einfachem Dexamethason bei 4,7 %, von Hydrocortison bei 14,5 % und von Corticosteron bei 100 %. Nach Injektion von 0,5 mg Dexamethason/100 g Rattenkörpergewicht kommt es nach 6 Stunden zu einem Abfall des Plasmacorticosterons, der sich zeitlich und größenordnungsmäßig in einem Bereich bewegt, wie er nach operativer Hypophysektomie oder nach Adrenalektomie gefunden wird. Mit Hilfe dieser Methode konnte ACTH mit einem Genauigkeitsindex von  $\lambda = 0,28$  und einer Empfindlichkeit von 0,1 mE als unterste Grenze nachgewiesen werden. Die Bestimmung von ACTH an Hand des Plasmacorticosteron-Anstiegs bei der Ratte hat gegenüber anderen Verfahren den Vorteil größerer Einfachheit, Billigkeit und relativer Empfindlichkeit.

### III. Frühere Bestimmungen der Halbwertszeit von ACTH

Die in früheren Arbeiten angegebenen Überlebenszeitmessungen von exogenem ACTH wurden mit weniger empfindlichen Verfahren durchgeführt und weisen deshalb unterschiedliche Ergebnisse auf. So belasteten Greenspan et al. (1950) 440 - 500 g schwere Ratten mit 5 E spezies - differentem ACTH i.v.. Die Tiere wurden anschließend entblutet, der ACTH-Gehalt auf Grund des Ascorbinsäureabfalls nach dem Sayers-Test bestimmt. Nur 6 % der injizierten ACTH-Menge konnte im Plasma nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit betrug 5,5 Min.. Ebenfalls mit dem Sayers-Test erhielten

Richards et al. (1950) eine Halbwertszeit von 15 Minuten, indem sie hypophysektomierten Ratten spezies-differente Hypophysenextrakte i.v. injizierten.

Wesentlich niedriger lagen die Halbwertszeiten bei spezies-identischem ACTH. Van Dyke et al. (1950) führten Überlebenszeitmessungen an Parabiost-Ratten unter Verwendung von endogenem ACTH durch. Sie bestimmten eine Halbwertszeit von einer Minute. Für exogen zugeführtes ACTH geben Richards und Sayers (1951) unter Verwendung von hypophysektomierten Ratten eine Halbwertszeit von zwei Minuten an, während Sydner und Sayers (1953) mit ihrem Wert in dem von Van Dyke angegebenen Bereich liegen.

Lazo-Wasen und Hier (1955) injizierten hypophysektomierten Ratten 10 E heterologes ACTH subcutan. Die höchste Hormonkonzentration im Blut lag zwischen 4 - 8 Minuten nach der Injektion, während nach 25 Minuten der Ascorbinsäureabfall unter dem Meßbereich lag.

Erstmals führten Meakin et al. (1959) bei gesunden Probanden, Addison- und Cushingkranken Infusionen mit heterologem ACTH in Dosen von 25 - 50 E während 2 - 8 Stunden durch. Die Blutentnahmen erfolgten nach Beendigung der Infusion in kurzen Abständen, die letzte Abnahme nach 45 Minuten. Die Seren wurden eingefroren und innerhalb von 12 Tagen an hypophysektomierten Hunden unter Kanulierung der Nebennierenvene getestet. Hierbei war es notwendig, den Zeitfaktor als Bezugsgröße zu nehmen. Deshalb mußte der jeweils während 10 Minuten vor und nach ACTH-Gabe gemessene Cortisol-Gehalt des Plasmas beim Hund verglichen werden. Es fanden sich Halbwertszeiten zwischen 4 und 8 Minuten.

Diese verhältnismäßig kurzen Halbwertszeiten zwischen 1 und 18 Minuten schienen uns im Gegensatz

zur Wirkung auch kleinster ACTH-Mengen beim Menschen zu stehen; denn auf Grund klinischer Beobachtungen wissen wir, daß niedrige, konsequent zugeführte ACTH-Dosen in Form intravenöser Infusionen eine deutliche Mehrsekretion an Steroidhormonen zur Folge haben.

In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb neue Untersuchungen über die biologische Halbwertszeit von exogen zugeführtem ACTH im menschlichen Blut besprochen werden, die mit dem ACTH-Test ausgeführt wurden, der auf dem Corticosteronanstieg im Blut bei der Ratte nach Hypophysenblockade mit Dexamethason beruht.

## B. Versuchsordnung und Methodik

Die für unsere Überlebenszeitmessungen von ACTH notwendigen Untersuchungen erfolgten sämtlich an gesunden Probanden. Ihr durchschnittliches Körpergewicht betrug 70 kg. Alle Injektionen und Infusionen wurden mit dem ACTH der Firma Organon, München, durchgeführt.

Nach eigenen Erfahrungen erwies es sich als günstig, das Blut direkt im Labor abzunehmen, um die Zeit zwischen Blutentnahme, Abzentrifugieren der Blutkörperchen und Einfrieren des Plasmas in der Tiefkühltruhe so kurz wie möglich zu halten. Längeres Verweilen des ACTH-haltigen Blutes bei Zimmertemperatur führte zu einer Abnahme der ACTH-Konzentration. Von jeder Blutentnahme wurden exakt 2 ccm Serum für den ACTH-Test verwendet. Eigene Untersuchungen hatten keinen Unterschied bei der ACTH-Bestimmung in Serum und Plasma ergeben.

### I. Allgemeine Versuchsordnung

In der 1. Versuchsreihe wurden jeweils 10 E, 25 E und 50 E ACTH i.v. injiziert und nach 3 Minuten zum erstenmal Blut aus der Cubitalvene entnommen. Weitere Blutentnahmen erfolgten in Abständen von 10 Minuten.

In der 2. Versuchsreihe wurden 25 E ACTH kontinuierlich über 4 Stunden infundiert; die Blutentnahmen führten wir nach 2 Stunden und am Ende der Infusion durch.

Außerdem bestimmten wir noch die Halbwertszeit aus der abfallenden Kurve des ACTH-Spiegels; die dafür notwendigen Blutentnahmen folgten 30 und 60 Minuten nach Beendigung der Infusion.

Die Errechnung der Halbwertszeiten erfolgte in der ersten Versuchsreihe aus den abfallenden Kur-

ven nach Injektionen. In der zweiten Versuchsreihe errechneten wir die Halbwertzeit auf Grund der Blutspiegelgesetze nach Dost (1953) aus dem Anstieg von ACTH im Serum während der Infusionen.

Der von diesem Autor aufgestellten Funktion für die Halbwertzeit eines Hormons unter Berücksichtigung von kontinuierlicher Tropfinfusion und kontinuierlicher Elimination liegen folgende Gesetzmäßigkeiten zugrunde:

Um die Halbwertzeit  $t$  des Hormons zu ermitteln, bedient Dost sich der Beziehung

$$(1) \quad y = a \cdot e^{-k_2 t_{\text{halb}}}$$

Diese Gleichung beschreibt die Elimination eines Ausgangsblutspiegels  $a$  zur Zeit  $t_0$  nach Beendigung der Infusion. Setzen wir in die Gleichung (1) für  $y$  den Quotient  $\frac{a}{2}$  ein, was nach der Definition der Halbwertzeit den um die Hälfte verminderten Anfangsblutspiegel bedeutet, so kommen wir zu dem Resultat

$$(2) \quad 0,5 = e^{-k_2 t_{\text{halb}}}$$

Die Gleichung (2) enthält jetzt nur noch eine Variable, nämlich  $k_2$ , die Eliminationskonstante. Sie kann nach der Gleichung

$$(3) \quad y = \frac{a}{t_0 \cdot k_2} (1 - e^{-k_2 t})$$

errechnet werden, ohne daß der Quotient  $\frac{a}{t_0}$  be-

kannt sein muß; es sind nur zwei sorgfältig ermittelte Meßwertpaare erforderlich - die Zeit  $t$  und die ihr entsprechende Hormonkonzentration  $y$  - (Tab. 2: hier ist  $t$  als "Stunden nach Beginn der ACTH-Infusion" angegeben,  $y$  als "mE ACTH im menschlichen Serum"). Durch den folgenden Rechenvorgang, bei dem die Gleichung (3) nach  $k_2$  aufgelöst werden muß, fällt  $\frac{a}{t_0}$  aus;  $k_2$  wird nun in die Gleichung (2) eingesetzt und daraus  $t_{\text{halb}}$  bestimmt.

## II. Die Methodik der ACTH-Bestimmung

### 1. Die Hypophysenblockade mit Dexamethason

180 - 200 g schweren männlichen Albino-Wistar-Ratten wurde 5 - 7 Stunden vor Beginn der Operation etwa 1 mg Dexamethason zur chemischen Hypophysenblockade in die Schwanzvene injiziert. Der Normalspiegel von 30 - 40  $\gamma$  Cortocosteron/100 ml Blut bei der Ratte sank während der maximalen Hemmungszeit 5 - 6 Stunden nach der Injektion auf 4 - 8  $\gamma$ /100 ml im peripheren Blut ab, was der Eigenfluoreszenz des Plasmas entspricht.

### 2. Die operative Technik

Nach der Narkose mit Nembutal (einer Äthyl-1-Methylbutyl-Barbitursäure) - etwa 3,5 mg/100 g Rattengewicht, verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ml und durch die Schwanzvene injiziert - wurde das Tier mit der dorsalen Seite auf den Operationstisch fixiert (Abb. 1). Fell und Fascie über der V. jugularis wurden anschließend abpräpariert. Zur Kanulierung benutzt man am besten einen etwa 15 cm langen PVC-Katheter (Clay-Adams, New York, PE 50). Von der freigelegten V. jugularis wurde die Gefäßscheide entfernt, anschließend um das Gefäß zwei Schlingen gelegt und die obere fest zugezogen. Mit einer feinen, gera-

den Pinzette wurde dann das Gefäß angehoben und schräg eingeschnitten. Mit Hilfe einer zweiten, etwas gebogenen Pinzette kann nun das Gefäß aufgehalten, der flach angespitzte Katheter eingeführt und mit der unteren Gefäßschlinge eingebunden werden. Zur Operation wurde immer die V. jug. sin. gewählt, da hier die anatomischen Bedingungen günstiger sind, um den Katheter direkt bis in das rechte Herz vorzuschieben. Andernfalls behindern die zahlreichen Venenklappen das Absaugen von Blut.

Im Anschluß an diesen Operationsvorgang wurden dem Versuchstier 1 1/2 ccm Blut über den Katheter mit einer Tuberkulinspritze langsam abgesaugt und in ein Wassermannröhrchen mit einem Tropfen Liquemin zur Gerinnungshemmung gespritzt (Erstwert). Derselbe Katheter konnte anschließend zur Injektion von 2 ccm ACTH-haltigem menschlichen Serum verwendet werden, das vorher in der Tiefkühltruhe bei minus 25 - 30° C aufbewahrt und erst kurz vor der Injektion aufgetaut wurde. Nach einer Wartezeit von 5 Minuten wurden der Ratte erneut 1 1/2 ccm Blut via Katheter entnommen (Zweitwert). Um den Flüssigkeitsverlust des Tieres auszugleichen, mußte nach der letzten Abnahme etwa 1 ccm physiologische Kochsalzlösung injiziert werden. Der Katheter wurde dann gezogen und die Operationswunde sorgsam geklammert. Danach konnten diese Tiere jeweils noch für andere Versuchszwecke Verwendung finden. Das nach dem Zentrifugieren aus dem Blut gewonnene Plasma wurde dann für die Corticosteronbestimmung in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt.

3. Die Bestimmung von Corticosteron im Rattenplasma  
Die Corticosteronbestimmungen wurden nach der Methode von Zenker und Bernstein (1958) durchge-

führt, die eine Kombination der doppelten Extraktionstechnik nach Silber und Porter (1954) mit einer Modifikation der von Sweat (1954) entwickelten Fluoreszenztechnik darstellt. Untersuchungen von Bernstein (1950) und von Hechter und Pincus (1954) haben ergeben, daß die Nebennierenrinden der Ratte hauptsächlich Corticosteron sezernieren und nach Bush (1953) nur etwa 2,5 % andere Steroide.

#### Reagenzien:

Chloroform p.A., Merck, Darmstadt

0,1 n NaOH p.A., Merck, Darmstadt

Konz. Schwefelsäure p.A., Merck, Darmstadt

Äthylalkohol 96 % p.A., Merck, Darmstadt

Vor Beginn der Bestimmung wird das Fluoreszenzreagenz mit konz. Schwefelsäure und 50 %-igem Äthylalkohol im Verhältnis 2,4 : 1 angesetzt und nach dem Abkühlen bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

#### a) Extraktionsverfahren

Hierbei wird das Corticosteron mit Hilfe von Chloroform als Lösungsmittel aus dem Serum extrahiert.

Serummengen von 0,5 ml werden jeweils in ein Zentrifugenglas abpipettiert, das 50 ml faßt. Das Serumvolumen wird mit Aqua dest. auf 3 ml ergänzt. In dieser Form kann die Substanz eingefroren werden. Der nun folgende Arbeitsgang wird in gleicher Weise mit zwei Zentrifugengläsern, die je 3 ccm Aqua dest. enthalten, als Leerwert durchgeführt. Anschließend werden 45 ml Chloroform zugefügt und 15 Sekunden lang geschüttelt. Daraufhin wird auf Stufe 2 ( = 2500 rpm ) zentrifugiert (Stockzentrifuge, Marburg/L.). Man

erhält einen eiweißhaltigen Wasserspiegel, der mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe - an der eine Kapillare angeschlossen ist - sorgsam entfernt werden muß. Fremdsubstanzen werden mit NaOH ausgewaschen, wobei 4,5 ml in jedes Glas abgefüllt werden. Erneut wird 15 Sekunden lang geschüttelt, auf Stufe zwei zentrifugiert und die wässrige Schicht entfernt.

In je ein Zentrifugenglas werden 15 ml Chloroformextrakt gefüllt und 3 ml vom Fluoreszenzreagenz hinzugefügt. Nach dem Schütteln von 15 Sekunden wird wieder auf Stufe zwei zentrifugiert und die Chloroformschicht dann restlos abgesaugt. Erst nach 1 1/2 Stunden ist die Bindung der Schwefelsäure an das Corticosteron vollständig.

#### b) Fluoreszenzmessung des Corticosterons und Berechnung

Zur Messung des Corticosterons wurde das Photometer "Eppendorf" mit dem Fluoreszenzzusatzgerät benutzt. Als Filter verwendeten wir ein Primärfilter von 436 m $\mu$ , ein Sekundärfilter von 500 - 3000 m $\mu$  und das Fluoreszenz-Glas-Standard mit der Nr. 5603. Das zum Eppendorf-Photometer zugehörige Sekundärfilter von 500 - 3000 m $\mu$  entspricht zwar nicht dem Maximum des Fluoreszenzspektrums vollständig, ist aber nach den Untersuchungen von Lohmann (1960) aus unserem Laboratorium für die Messungen ausreichend. Nach Einsetzen der mit der Meßlösung gefüllten Quarzküvette in den Halter des Zusatzgerätes wird der Ausschlag mit dem Feinregler auf den Skalenteil 100 eingestellt und die Küvette in den Strahlengang gebracht. Nach Verstärken des Strahlenganges kann die Sekundär-Licht-Emission als Extinktionseinheit gemessen werden. Nach Abzug des Leer-

wertes von der Extinktion der Meßlösung erhält man die sog. Extinktionsdifferenz, mit deren Hilfe aus der Corticosteron-Eichkurve der Corticosteron-gehalt abgelesen werden kann. Der Corticosterongehalt pro 100 ml errechnet sich aus der Formel:

$$C = \frac{A \times 100}{V}$$

C ist die Corticosteron-Konzentration in Gamma/100 ml Serum, V ist die Menge der Meßlösung in ml, A ist der Corticosterongehalt, der aus der Eichkurve abzulesen ist; bei der Aufstellung einer Corticosteron-Eichkurve wurde der Anstieg des Corticosterons in Abhängigkeit von zugeführten ACTH-Mengen im semilogarithmischen System aufgetragen.

## C. Ergebnisse

### I. Die Halbwertszeit von ACTH nach Injektion verschieden großer Hormonmengen ( 10 E, 25 E und 50 E )

Die von uns gemessenen Blutspiegelwerte im menschlichen Serum - 5 Minuten nach der Injektion - zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der gewählten ACTH-Dosis. Sie wird ersichtlich aus der Gegenüberstellung der Werte in Tab. 1 und der graphischen Übersicht in Abb. 2.

Innerhalb von 30 Minuten fielen die Hormon-Spiegel im menschlichen Serum nach Injektion von 10 E ACTH von 50 mE auf 9,5 mE/100 ml, nach Injektion von 25 E von 85 mE auf 8,5 mE/100 ml und nach Injektion von 50 E von 120 mE auf weniger als 13 mE/100 ml Serum.

Auch in den darauf folgenden Minuten blieb noch eine gewisse Restfluoreszenz erhalten; hierbei handelt es sich wahrscheinlich um im Serum vorhandene Ballaststoffe, die beim Extraktionsverfahren nicht eliminiert werden können.

Alle in 5- bis 10-Minutenabständen gemessenen ACTH-Werte zeigten graphisch dargestellt in der 1. Phase einen sehr raschen Abfall, dem in einer 2. späteren Phase ein langsamer Abfall folgte. Der primär starke Abfall richtete sich nach der Hormondosis. Er war um so steiler, je höher die Dosis gewählt worden war. Alle abfallenden Blutspiegelkurven, sowohl nach einmaliger Injektion als auch nach den weiter unten beschriebenen kontinuierlichen Dauertropfinfusionen erwiesen sich als exponentielle Funktionen und konnten im semilogarithmischen System als Gerade dargestellt werden (Abb. 3). Die Steigungen dieser Geraden sind Ausdruck der Eliminationsgeschwindigkeit des zugeführten ACTH. Die Halbwertszeiten konnten damit aus den in Abb. 3 aufgezeigten exponentiellen Verlaufskurven leicht abgelesen werden. Nach Injektion von 50 E ACTH ergibt sich somit eine Halbwertszeit von

5,5 Minuten, nach 25 E ACTH eine von 10 Minuten,  
nach 10 E ACTH eine von 15 Minuten.

## II. Die Halbwertszeit von ACTH nach intravenöser Dauertropfinfusion von 25 E

Während der kontinuierlichen ACTH-Infusionen wurden relativ hohe ACTH-Konzentrationen im Serum der Probanden gemessen (Tab. 2). Ihr Anstieg betrug 2 Stunden nach Beginn der Infusion 35,5 mE ACTH/100 ml im Serum; nach weiteren 2 Stunden, am Ende der Infusion, 60 mE/100 ml im Serum. Allerdings konnten diese Werte nicht im semilogarithmischen System als Gerade dargestellt werden, so daß die von uns nach den Blutspiegelgesetzen von Dost durchgeführten Berechnungen der Halbwertszeit mathematisch nicht ganz korrekt sind (Abb. 4). Aus den während der Infusionen von uns gemessenen ACTH-Werten im Serum läßt sich eine Halbwertszeit von 3 Stunden und 45 Minuten (=225 Min.) berechnen.

Nach Beendigung der 4-stündigen Infusionen wurde ein überraschend hoher ACTH-Spiegel gefunden. Er entspricht 71 % des Wertes, den wir nach 5 Minuten bei einmaliger Injektion der gleichen Hormondosis messen konnten. Der Abfall der Blutspiegelkurven war nach Beendigung der Infusionen in der ersten Phase weniger rasch als nach den einmaligen Injektionen und zeigte auch im weiteren Verlauf keine eindeutige Änderung gegenüber der ersten Eliminationsphase (Abb. 2). Die Hormonkonzentrationen fielen in den ersten 30 Minuten um fast die Hälfte ab; von 60 mE ACTH/100 ml Serum auf 36 mE und nach weiteren 30 Minuten auf 13 mE. Sämtliche Kurven konnten wiederum im semilogarithmischen System als Gerade dargestellt werden (Abb. 3). Die Halbwertszeit war entsprechend ihrem viel flacheren Verlauf mit 29 Minuten deutlich länger als nach den einmaligen Injektionen.

#### D. Besprechung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wird über die Messung der biologischen Halbwertszeit von exogenem ACTH im menschlichen Blut berichtet. Die Zuführung des Hormons erfolgte einerseits durch einmalige Injektion in verschiedenen Dosen, andererseits durch kontinuierliche Dauertropfinfusion.

Der ACTH-Spiegel, der jeweils 5 Minuten nach der einmaligen Injektion bestimmt wurde, war erwartungsgemäß von der gewählten Dosis abhängig: Einer Gabe von 10 E ACTH entsprach ein Spiegel von 50 mE %; einer Gabe von 25 E bzw. 50 E entsprachen Spiegel von 85 bzw. 120 mE %. Diese Werte fielen, wie die einfache graphische Darstellung zeigt, in einer ersten Phase um so steiler ab, je höher der Ausgangswert lag, um dann nach einem durch die Meßzeiten gegebenen Knick flacher und annähernd parallel auszulaufen.

Im semilogarithmischen Koordinatensystem dagegen konnten alle gemessenen Blutspiegelverläufe annähernd als Gerade dargestellt werden. Sie entsprachen damit exponentiellen Funktionen, an denen sich die Halbwertszeit der jeweils zugrunde liegenden ACTH-Dosen leicht ablesen lassen.

Zwar liegen alle hier nach einmaliger Injektion errechneten Halbwertszeiten in dem von verschiedenen Autoren angegebenen Bereich von 1 bis 18 Minuten; die konstante Abhängigkeit der Halbwertszeit von der gewählten Dosis war bisher jedoch nicht bekannt.

Es ergibt sich aus den vorliegenden Untersuchungen ein reziprokes Verhalten von Halbwertszeit zu Ausgangsdosis: je höher der anfängliche Spiegel des Hormons, desto kürzer seine biologische Halbwertszeit im Blut. Die Deutung dieses Befundes können Beobachtungen entsprechender endokriner Phänomene erleichtern. Einmal ist von einem anderen Hormon, dem Thyroxin (Purvis und Adams, 1960), eine Bindung an bestimmte Träger -

Proteine im menschlichen Plasma bekannt. Bei diesem Hormon wird eine freie, ungebundene und wahrscheinlich biologisch aktive Fraktion von einer an Eiweiß gebundenen Fraktion unterschieden. Aber auch bei einem Steroidhormon ist ein derartiges Verhalten festzustellen. So beschrieben Slaunwhite und Sandberg (1959) beim Morbus Cushing eine von der Norm abweichende Bindung von Cortisol an Plasmaeiweiß, welche wo möglich zu einer fehlerhaften Regulation der den corticotropin-releasing-factor (CRF) produzierenden Zwischenhirnzentren führt. Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde die "Transcortin-Theorie" beim Cushing-Syndrom postuliert. Alle diese Beobachtungen berechnen in Verbindung mit den vorliegenden Ergebnissen zu der Annahme, daß sich bei einmaliger rascher Injektion einer großen ACTH-Dosis nur wenig Hormon an das Träger-Protein bindet und der größere Teil einer schnellen Elimination oder Inaktivierung unterliegt. Bei den kontinuierlichen Dauertropfinfusionen kommt aber pro Zeiteinheit nur so wenig ACTH in die Blutbahn, daß ein größerer Prozentsatz gebunden werden kann und so der nur langsamen Elimination unterworfen ist. Es resultiert daher nach Beendigung der Infusionen eine Halbwertszeit, die mit 29 Minuten eindeutig länger ist als alle in der Literatur mitgeteilten Daten.

Die Berechnung der während der Infusion geltenden Halbwertszeit ergibt 225 Minuten. Mathematisch ist dieser Wert nicht ganz exakt. Nach den Blutspiegel-formeln von Dost haben wir für das ACTH eine Eliminationskonstante  $k_2 \approx 0,1845$  errechnet. Da, wie wir oben gesehen haben, während kontinuierlicher Dauertropfinfusion keine konstante Halbwertszeit für ACTH besteht, sondern vielmehr während der Infusionen bei ständig wechselnden ACTH-Blutspiegeln auch ständig wechselnde Halbwertszeiten angenommen werden müssen, ist die für die Anwendung der Dost'schen Formel vor-

ausgesetzte Konstanz der Bedingungen nicht ganz erfüllt. Allein auf Grund der relativ hohen ACTH-Spiegel aber, die während der Infusion gemessen werden konnten, ist während kontinuierlicher Dauerzufuhr mit einer verlängerten Halbwertszeit zu rechnen.

Dieses Ergebnis findet in klinischen Erfahrungen seine Entsprechung. So ist beim ACTH-Belastungstest zur Stimulierung der Funktionsreserve der Nebennierenrinde ein sehr viel größerer Anstieg der Steroidmetaboliten im Harn zu beobachten, wenn dem Patienten dieselbe ACTH-Menge statt in Form einer einmaligen Injektion als Dauertröpfcheninfusion verabfolgt wird.

In jüngster Zeit konnten Retiene et al. (1963) die für den Cortisol-Blutspiegel des Gesunden schon länger bekannte charakteristische Tagesrhythmik mit einem hohen morgendlichen Gipfel und einem Tiefpunkt um Mitternacht ebenfalls für das endogene ACTH nachweisen. Diese Tagesrhythmik scheint bei Cushing-Kranken auf dem Boden einer bilateralen Nebennierenrinden-Hyperplasie aufgehoben zu sein (Pfeiffer et al. (1963), Lipscomb (1963)). Hinreichend erklärt werden diese Befunde jedoch nicht dadurch, daß beim Morbus Cushing lediglich der Funktionskreis zwischen der ACTH-Sekretion und dem Cortisolspiegel im Blut gestört ist und der Bremseffekt des Cortisols erst auf einem höheren Niveau eintritt. So behandelten Retiene et al. (1964) Nebennieren-Gesunde längere Zeit mit Cortisonderivaten und fanden nicht nur ein Fehlen der physiologischen Tages- und Nachtrhythmik von ACTH und Cortisol, sondern die Werte bewegten sich auch auf einem konstant niedrigen Niveau. Schon Nugent et al. (1960) und Liddle et al. (1960) nahmen ein sog. "dribbling" für die Cushing-Krankheit an.

Die vorliegenden Untersuchungen stützen diese Anschauung durch das Experiment. In dem gleichen Maße wie die Dauerzufuhr von exogenem ACTH zu einer eindeutig verlängerten Halbwertszeit im Blut führt, so ist bei kontinuierlicher Dauersekretion von körpereigenem ACTH

allein durch eine verlängerte Halbwertszeit des endogenen Hormons auf die Dauer eine Hyperplasie der Nebennierenrinde und die Ausbildung eines Cushing-Syndroms denkbar.

Für die Zukunft besteht die Aufgabe, im Blut das vermutete "freie" von dem "gebundenen" ACTH abzutrennen und die Relation der Anteile zu bestimmen. Die Untersuchung von Normalpersonen und Cushing-Kranken könnte eventuell die hier mitgeteilten Beobachtungen und Vorstellungen über die Halbwertszeit von ACTH beim Menschen bestätigen und damit einen Beitrag zur Klärung der hypophysären Pathogenese des Morbus Cushing liefern.

## E. Zusammenfassung

An Hand eines in-vivo-Tests, der auf dem Corticosteronanstieg im Rattenplasma beruht, wurden Halbwertzeitbestimmungen von ACTH im menschlichen Blut ausgeführt; in einer ersten Versuchsreihe nach einmaliger Injektion, in einer zweiten während und nach Beendigung von Infusionen des Hormons, die sich über 4 Stunden erstreckten. ACTH-Bestimmungen in Plasma und Serum erbrachten gleiche Resultate.

Übereinstimmend nahmen die Konzentrationen des Nebennierenrinden-stimulierenden Hormons unmittelbar nach der Applikation zunächst rascher, dann zunehmend langsamer ab; sie folgten so exponentiellen Funktionen, die im semilogarithmischen System Geraden mit leicht ablesbarer Halbwertzeit ergaben.

Eindeutige Unterschiede zeigten sich je nach Art der Zufuhr des Hormons.

1. Nach einmaliger Injektion wurde ein reziprokes Verhalten von Ausgangsdosis und Halbwertzeit offenbar: Dosen von 10, 25 und 50 E entsprachen Halbwertzeiten von 15, 10 bzw. 5,5 Minuten. Diese Zeiten bewegen sich im Bereich der in der Literatur angegebenen von 1 - 18 Minuten; die Dosisabhängigkeit war bisher nicht bekannt.
2. Während der kontinuierlichen Dauertropfinfusionen von 25 E über 4 Stunden ergab sich eine extrem verlängerte Halbwertzeit von 225 Minuten; nach Beendigung der Infusionen wurde eine Zeit von 29 Minuten gefunden.

Zur Deutung dieser Befunde wurden Erfahrungen der Klinik und Beobachtungen bei anderen Hormonen herangezogen. Beim ACTH-Test der Nebennierenrinden-Diagnostik zeigt die Hormonzufuhr durch Infusion die größte Wirkung; die Hormone Thyroxin und Cortisol können im Blut

als an Eiweiß gebundene Formen auftreten. Es wird daraus der Schluß gezogen, daß auch für die Halbwertszeit des ACTH die Bindung an Serum-Proteine sowie die von der Zufuhr abhängige Bindungskapazität von Bedeutung sein können.



Abb. 1. Kanulierungstechnik von Vena cava cranialis  
und caudalis

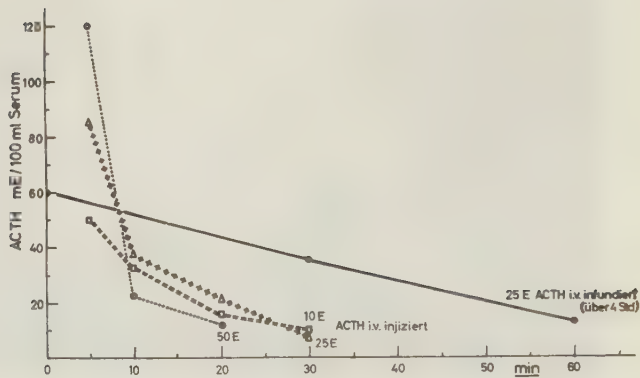


Abb. 2. Abfall der ACTH-Konzentration im menschlichen Blut nach verschiedenen i.v.-Injektionen (10 E, 25 E, 50 E) und nach Beendigung der Infusionen mit 25 E ACTH

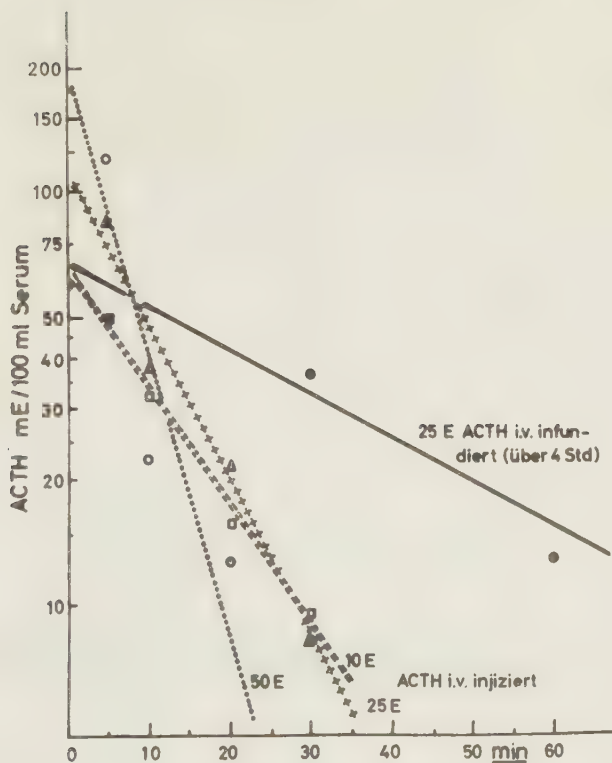


Abb. 3. Exponentieller Abfall des ACTH-Spiegels im menschlichen Blut nach verschiedenen intravenösen ACTH-Gaben im semilogarithmischen System

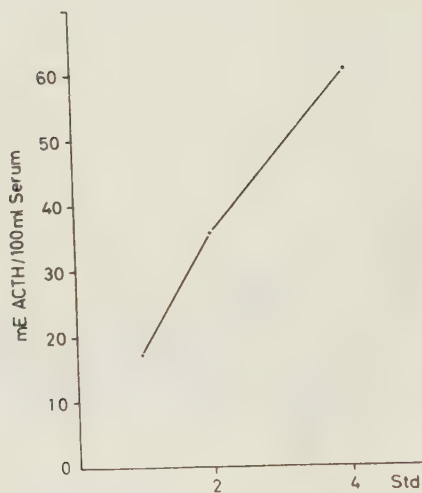


Abb. 4. Anstieg des ACTH-Spiegels im menschlichen Blut während ACTH-Infusionen (25E/4 Stunden)

| Zeit<br>(Min.) | 10E ACTH i.v.                                                                           |     |                                       | 25E ACTH i.v.                                                                           |     |                                       | 50E ACTH i.v.                                                                           |     |                                       |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------|
|                | Corticosteron-<br>Anstieg<br>im peripheren<br>Plasma der Ratte<br>( $\mu\text{g } \%$ ) | (n) | ACTH im<br>menschl.<br>Serum<br>(mE%) | Corticosteron-<br>Anstieg<br>im peripheren<br>Plasma der Ratte<br>( $\mu\text{g } \%$ ) | (n) | ACTH im<br>menschl.<br>Serum<br>(mE%) | Corticosteron-<br>Anstieg<br>im peripheren<br>Plasma der Ratte<br>( $\mu\text{g } \%$ ) | (n) | ACTH im<br>menschl.<br>Serum<br>(mE%) |
| 5'             | $11,0 \pm 1,20$                                                                         | 4   | 50,0                                  | $13,3 \pm 1,30$                                                                         | 6   | 85,0                                  | $15,2 \pm 0,96$                                                                         | 4   | 120                                   |
| 10'            | $9,0 \pm 1,10$                                                                          | 5   | 33,5                                  | $9,5 \pm 1,10$                                                                          | 6   | 37,0                                  | $7,2 \pm 0,96$                                                                          | 4   | 22                                    |
| 20'            | $6,0 \pm 0,87$                                                                          | 5   | 16,5                                  | $6,8 \pm 1,09$                                                                          | 5   | 20,5                                  | $4,5 \pm 0,98$                                                                          | 4   | 13                                    |
| 30'            | $1,0 \pm 0,55$                                                                          | 4   | 9,5                                   | $2,3 \pm 0,87$                                                                          | 4   | 8,5                                   |                                                                                         |     |                                       |

Tab. 1. Änderung des ACTH-Spiegels im peripheren Blut des Menschen nach Injektion von  
10 E, 25 E und 50 E

| 25E ACTH i.v.                                     |                                                                                         |     |                                       |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------|
| Stunden nach Beginn<br>der<br>ACTH-Infusion       | Corticoosteron-<br>Anstieg<br>im peripheren<br>Plasma der Ratte<br>( $\mu\text{g} \%$ ) | (n) | ACTH im<br>menschl.<br>Serum<br>(mE%) |
| 2 <sup>h</sup>                                    | $9,4 \pm 1,60$                                                                          | 7   | 35,5                                  |
| 4 <sup>h</sup>                                    | $12,3 \pm 2,80$                                                                         | 9   | 60,0                                  |
| Minuten nach Beendi-<br>gung der<br>ACTH-Infusion |                                                                                         |     |                                       |
| 30'                                               | $9,5 \pm 1,20$                                                                          | 6   | 36,0                                  |
| 60'                                               | $4,7 \pm 1,20$                                                                          | 6   | 13,0                                  |

Tab. 2. Änderung des ACTH-Spiegels im peripheren Blut des Menschen während der Infusionen von 25 E ACTH über 4 Stunden und nach Beendigung der Infusionen

## Literaturverzeichnis

- Bazemoore, G.W., J.W. Richter, D.E. Ayer, J. Finnerty, N.G. Brink and K. Folkers: Pituitary Hormones. IV. The preparation of potent concentrates of corticotropin-A and corticotropin-B. J. Amer. Chem. Soc. 75, 1949 (1953)
- Bell, Ph.: Structure of  $\beta$ -Corticotropin. Final sequence studies. J. Amer. Chem. Soc. 77, 3419 (1955)
- Bernstein, D.T.: Transplantation of adrenal glands in the spleen of rats. Proc. Soc. Exp. Biol. 75, 847 (1950)
- Boissonnas, R.A., S. Guttmann, J.P. Waller and P.A. Jaquenoud: Synthesis of a Polypeptide with ACTH-like structure. Experientia 12, 446 (1956)
- Bush, I.E.: Species differences and other factors influencing adrenocortical secretion. Ciba Found. Coll. End. 7, 210 (1953)
- Dost, F.H.: Der Blutspiegel (Kinetik der Konzentrationsabläufe in der Kreislaufflüssigkeit). G. Thieme Verlag, Leipzig (1953)
- Van Dyke, D.C., M.E. Simpson, C.H. Li and St.M. Evans: Survival in the circulation of the growth and adrenocorticotrophic hormone as evidenced by parabiosis. Am. J. Physiol. 163, 297 (1950)
- Greenspan, F.S., C.H. Li and H.M. Evans: Disappearance rate of ACTH from rat's plasma after i.v. injection. Endocrin. 46, 261 (1950)
- Hechter, O. and G. Pincus: Genesis of adrenocortical secretion. Physiol. Rev. 34, 459 (1954)
- Lazo-Wasen, E.A. and S.W. Hier: Blood ACTH levels following subcutaneous injections.

- Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 90, 380 (1955)
- Lee, T.H., A.B. Lerner and V. Buettner-Janusch:  
Isolation and structure of human corticotrophin.  
J. Am. Chem. Soc. 81, 6084 (1959)
- Liddle, G.W., W.C. Williams, jr. and A. Walser: Die Bedeutung von ACTH für die Pathogenese der Cushing'schen Erkrankung.  
Schweiz. Med. Wschr. 90, 1325 (1960)
- Li, C. H., L.L. Geschwind, R.D. Cole, I. Raacke: Amino acid sequence of alpha-corticotropin. Nature, London, 176, 687 (1955)
- Li, C. H., J.S. Dixon and D. Chung: The Amino acid sequence of bovine adrenocorticotropin.  
Biochem. Biophys. Acta 46, 324 (1961)
- Lipscomb, H.S. and D.H. Nelson: Measurement of corticosteron in rat adrenal venous plasma as bioassay for ACTH.  
Fed. Proc. 18, 95 (1959)
- Lipscomb, H.S.: Persönliche Mitteilung (1963)
- Lohmann, Ch.: Über die Bestimmung kleinster Mengen von Corticosteron mittels Messung der durch  $H_2SO_4$  induzierten Fluoreszenz des Steroidhormons. Angleichung des Verfahrens an das Fluoreszenzaufsatzgerät des Photometers Eppendorf. Inaugural-Dissertation, Universität Frankfurt am Main (1960)
- Meakin, J.W., J.E. Bethune, R.H. Despointes and D.H. Nelson: The rate of disappearance of ACTH activity from the blood of human subjects (Letter to the editor).  
J. Clin. Endocrin. 19, 1491 (1959)
- Munson, P.L. and W. Toenel: Detections of minute amounts of adrenocorticotrophic hormone by the effect on adrenal venous ascorbic acid.  
Endocrin. 63, 785 (1958)
- Nelson, D.H. and D.M. Hume: Corticosteroid secretion in the adrenal venous blood of the hypophy-

- sectomized dog as an assay for ACTH.  
Endocrinol. 57, 184 (1955)
- Nugent, Ch. A., K. Eik-Nes, H. S. Kent, L. Samuels and  
F. H. Tyler: A possible explanation for Cushing's  
syndrome associated with adrenal hyperplasia.  
J. Clin. Endocrin. 20, 1259 (1960)
- Pfeiffer, E. F., E. Vaubel, K. Retiene, D. Berg und H.  
Ditschuneit: ACTH-Bestimmung mittels Messung des  
Plasma-Corticosterons der mit Dexamethason  
hypophysektomierten Ratte.  
Klin. Wschr. 38, 980 (1960)
- Pfeiffer, E. F., F. Garmendia, E. Vaubel und K. Retiene:  
Exogene und endogene ACTH-Aktivitäten im nativen  
Plasma des Menschen.  
Erg. Inn. Med., N.F. 20, 127 (1963)
- Purvis, H. D. and D. D. Adams: Thyroid stimulating hormone.  
Br. Med. Bull. 16, 128 (1960)
- Retiene, K., A. Espinoza, Y. Ab-del-Rahman, K. H. Marx  
und E. F. Pfeiffer: Untersuchungen über den Transport  
und die Tagesrhythmik von endogenem ACTH im Blut bei  
Stoffwechselgesunden und Cushing-Kranken.  
10. Symposium, Deutsche Gesellschaft für Endo-  
krinologie, Wien, März 1963, S. 231-234.
- Retiene, K., H. E. Mentzel, R. Trinn, G. Schumann und E. F.  
Pfeiffer: Qualitative und quantitative Änderungen  
der ACTH-Aktivitäten, bei spontanen und therapeutisch  
bewirkten Über- und Unterfunktionszuständen der  
Nebennierenrinde des Menschen.  
11. Symposium, Deutsche Gesellschaft für Endo-  
krinologie, Düsseldorf, März 1964 (im Druck)
- Richards, I. B., M. Merkin and G. Savers: Fate of intra-  
venously administered adrenocorticotrophic hormone.  
J. Clin. Endocrin. 10, 809 (1950)
- Richards, I. B. and G. Savers: Fate and excretion of

adrenocorticotrophic hormone.

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 77, 87 (1951)

Savers, M.A., G. Savers and L.A. Woodbury: The assay of pituitary adrenocorticotrophic hormone by the adrenal ascorbic acid depletion method. Endocrin. 42, 379 (1948)

Schwyzer, R., W. Rittel, H. Kappeler und B. Iselin: Synthese eines Nonadeka-Peptides mit hoher corticotroper Wirksamkeit. Angew. Chemie 72, 915 (1960)

Silber, R.H. and C. Porter: The determination of 17, 21-Dihydroxy 20-Ketosteroids in urine and plasma. J. Biol. Chem. 210, 923 (1954)

Slaunwhite, W.R. jr. and A.A. Sandberg: Transcortin: a corticoid-binding protein of plasma. J. Clin. Invest. 38, 384 (1959)

Sweat, M.L.: Sulfuric acid induced fluorescence of corticosteroids. Analvt. Chem. 25, 773 (1954)

Sydnor, K.I. and G. Savers: Biological half-life of endogenous ACTH. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 83, 729 (1953)

White, W.F.: Studies on adrenocorticotropin. V. The isolation of corticotropin-A. J. Amer. Chem. Soc. 75, 503 (1953)

Zenker, N. and D.E. Bernstein: The estimation of small amounts of corticosteron in rat's plasma. J. Biol. Chem. 231, 659 (1958)

## Lebenslauf

Am 18. 6. 1934 wurde ich als Sohn des Bankkaufmanns Karl-Heinz Fischer und seiner Ehefrau, geb. Ahring, in Berlin-Wilmersdorf geboren. Nach vierjähriger Volksschulzeit in Berlin/Falkensee besuchte ich dort die Oberschule bis zum Kriegsende. Im Anschluß an die Flucht ging ich erneut von 1945 bis 1947 zur Volksschule in Sellenstedt, Kr. Alfeld a.d. Leine; nach fünfjährigem Mittelschulbesuch in Hildesheim erhielt ich 1952 das Zeugnis der Mittleren Reife. Von 1953 bis 1956 bereitete ich mich in Frankfurt am Main extern zum Abitur vor und legte im gleichen Jahr an der Oranienerschule in Wiesbaden die Reifeprüfung ab. 1957 habe ich das Medizinstudium in Frankfurt am Main begonnen und im Juli 1963 an der gleichen Universität das Staatsexamen bestanden. Ich habe die Absicht, nach Beendigung meiner Medizinalassistentenzeit, die ich am 1. 9. 1963 begonnen habe, meinen Facharzt für Innere Medizin zu erwerben. Seit Dezember 1963 bin ich verheiratet.

### Meine akademischen Lehrer waren:

|                             |                                     |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Prof. Dr. Dr. W. Artelt     | Geschichte der Medizin              |
| Prof. Dr. W. Amelung        | Naturheilkunde                      |
| Prof. Dr. R. Altmann        | Innere Medizin                      |
| Prof. Dr. H. Betke          | Arbeitsmedizin                      |
| Prof. Dr. H.G. Boenninghaus | Hals-, Nasen- und<br>Ohrenheilkunde |
| Priv. Doz. Dr. H. Brehm     | Frauenheilkunde                     |
| Prof. Dr. P. Christ         | Innere Medizin                      |
| Prof. Dr. M. Czerny         | Experimentalphysik                  |
| Prof. Dr. K. Felix          | Physiologische Chemie               |
| Prof. Dr. H. Fischer        | Innere Medizin                      |
| Prof. Dr. J. Frey           | Innere Medizin                      |
| Prof. Dr. H. Frick          | Anatomie                            |
| Prof. Dr. K. Frowein        | Neurologie                          |
| Prof. Dr. A. Gebauer        | Röntgenologie                       |
| Prof. Dr. R. Geißendörfer   | Chirurgie                           |
| Prof. Dr. H. Giersberg      | Zoologie                            |

Prof. Dr. K. Greven  
 Prof. Dr. E. Güntz  
 Prof. Dr. W. Halbsguth  
 Prof. Dr. R. Heinecker  
 Prof. Dr. E. Heinz  
 Prof. Dr. R. Heintz  
 Prof. Dr. L. Heller  
 Prof. Dr. K. Herzberg  
 Prof. Dr. H. Hildebrand  
 Prof. Dr. F. Hoff  
 Prof. Dr. P. Holtz  
 Prof. Dr. G. Kahlau  
 Prof. Dr. O. Käser  
 Prof. Dr. E. Landes  
 Prof. Dr. H. Lapp  
 Prof. Dr. G. Leonardi  
 Prof. Dr. W.A. Lieb  
 Prof. Dr. K. Luff  
 Prof. Dr. R. Mittermaier

Prof. Dr. H.A. Müser  
 Prof. Dr. R. Ortmann  
 Prof. Dr. E.F. Pfeiffer  
 Prof. Dr. B. Rajewsky  
 Prof. Dr. J. v. Reckow  
 Prof. Dr. W. Ried  
 Prof. Dr. L. Róka  
 Prof. Dr. W. Rotter  
 Prof. Dr. R. Royen  
 Prof. Dr. B. de Rudder  
 Prof. Dr. W. Sandritter  
 Priv. Doz. Dr. O. Schmith  
 Prof. Dr. W. Schneider  
 Prof. Dr. K. Schöfflin  
 Prof. Dr. W. Schrade  
 Prof. Dr. A.W. Schwenger  
 Prof. Dr. D. Starck  
 Prof. Dr. E. Ungeheuer  
 Prof. Dr. R. Thiel  
 Priv. Doz. Dr. W. Weber  
 Prof. Dr. E. Westermann  
 Prof. Dr. H. Westermann  
 Prof. Dr. K. Weiße  
 Prof. Dr. K. Wezler  
 Prof. Dr. Th. Wieland  
 Prof. Dr. H. Zimmermann  
 Prof. Dr. J. Zutt

Physiologie  
 Orthopädie  
 Botanik  
 Innere Medizin  
 Physiologische Chemie  
 Innere Medizin  
 Frauenheilkunde  
 Hygiene/Bakteriologie  
 Innere Medizin  
 Innere Medizin  
 Pharmakologie  
 Pathologie  
 Frauenheilkunde  
 Dermatologie  
 Pathologie  
 Dermatologie  
 Augenheilkunde  
 Gerichtsmedizin  
 Hals-, Nasen- und  
 Ohrenheilkunde  
 Experimentalphysik  
 Anatomie  
 Innere Medizin  
 Medizinische Strahlenkunde  
 Zahnheilkunde  
 Organische Chemie  
 Physiologische Chemie  
 Pathologie  
 Anorganische Chemie  
 Kinderheilkunde  
 Pathologie  
 Sozialhygiene  
 Anatomie  
 Innere Medizin  
 Innere Medizin  
 Frauenheilkunde  
 Anatomie  
 Chirurgie  
 Augenheilkunde  
 Chirurgie  
 Pharmakologie  
 Chirurgie  
 Kinderheilkunde  
 Physiologie  
 Organische Chemie  
 Pathologie  
 Psychiatrie/Neurologie

Frankfurt am Main, den 2. 1. 1965

*Handed Fischer*

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

### Die biologische Halbwertszeit von exogenem ACTH im menschlichen Blut

in der Abteilung für Klinische Endokrinologie der I. Medizinischen Universitätsklinik zu Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. med. E.F. Pfeiffer mit Unterstützung durch Dr. med. K. Retiene und Priv. Doz. Dr. med. H. Ditschuneit ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Von den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation wurden veröffentlicht: 1.) unter meiner Mitarbeit die Tab. 1, 2 und die Abb. 3, 4 nach Abfassung der Dissertation in der Arbeit: K. Retiene, M. Fischer, H. Ditschuneit und E.F. Pfeiffer: Biologische Halbwertszeit von exogenem ACTH im menschlichen Blut. 9. Symposium, Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie, Wiesbaden und Mainz, Mai 1962, S.95-98, 2.) die Abb. 3 in der Sammelarbeit: E.F. Pfeiffer, F. Garmendia, E. Vaubel und K. Retiene: Exogene und endogene ACTH-Aktivitäten im nativen Plasma des Menschen. Erg. Inn. Med., N.F. 20, 127 (1962).

Frankfurt am Main, den 2. 1. 1965

*Manfred Fischer*





